

112
PCT/JP 03/02833

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

20.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月11日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-065880

[ST.10/C]:

[JP2002-065880]

出 願 人

Applicant(s):

株式会社豊田中央研究所
トヨタ自動車株式会社

REC'D 16 MAY 2003
WIPO PCT

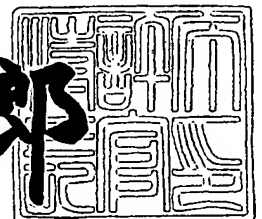
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 2日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3031175

【書類名】	特許願
【整理番号】	010770
【提出日】	平成14年 3月11日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N
【発明者】	
【住所又は居所】	愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株 株式会社豊田中央研究所内
【氏名】	石田 亘広
【発明者】	
【住所又は居所】	愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株 株式会社豊田中央研究所内
【氏名】	平井 正名
【発明者】	
【住所又は居所】	愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株 株式会社豊田中央研究所内
【氏名】	今枝 孝夫
【発明者】	
【住所又は居所】	愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株 株式会社豊田中央研究所内
【氏名】	宮崎 力
【発明者】	
【住所又は居所】	愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株 株式会社豊田中央研究所内
【氏名】	徳弘 健郎
【発明者】	
【住所又は居所】	愛知県豊田市トヨタ町一番地 トヨタ自動車株式会社内
【氏名】	齋藤 聡志

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町一番地 トヨタ自動車株式会社内

【氏名】 早乙女 理

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町一番地 トヨタ自動車株式会社内

【氏名】 保谷 典子

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町一番地 トヨタ自動車株式会社内

【氏名】 松尾 康生

【特許出願人】

【識別番号】 000003609

【氏名又は名称】 株式会社豊田中央研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000003207

【氏名又は名称】 トヨタ自動車株式会社

【代理人】

【識別番号】 100064344

【弁理士】

【氏名又は名称】 岡田 英彦

【電話番号】 (052)221-6141

【選任した代理人】

【識別番号】 100087907

【弁理士】

【氏名又は名称】 福田 鉄男

【選任した代理人】

【識別番号】 100105728

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 敦子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002875

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 乳酸高産生形質転換体及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA が導入されている形質転換体。

【請求項 2】 前記外来タンパク質をコードする DNA は、宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制御可能に導入されている、請求項 1 記載の形質転換体。

【請求項 3】 前記宿主生物は、サッカロマイセス属である、請求項 1 または 2 に記載の形質転換体。

【請求項 4】 前記宿主生物は、サッカロマイセス・セレピシエある、請求項 1 または 2 に記載の形質転換体。

【請求項 5】 前記外来タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログである、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項 6】 宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA が導入されており、

前記外来タンパク質をコードする DNA は、宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制御可能に導入されている、形質転換体。

【請求項 7】 前記宿主染色体上のプロモーターは、ピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子プロモーターである、請求項 6 記載の形質転換体。

【請求項 8】 前記宿主生物は、サッカロマイセス属である、請求項 6 または 7 に記載の形質転換体。

【請求項 9】 前記宿主生物は、サッカロマイセス・セレピシエである、請求項 6 または 7 に記載の形質転換体。

【請求項10】前記外来タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログである、請求項6～9のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項11】ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログをコードするDNAが、サッカロマイセス属の宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制御可能に導入されている、形質転換体。

【請求項12】前記宿主は、サッカロマイセス・セレビシエである、請求項10記載の形質転換体。

【請求項13】請求項1～12のいずれかに記載の形質転換体を培養する工程と、

前記工程で得られる培養物から乳酸を分離する工程、
とを備える、乳酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、乳酸の高生産技術に関し、詳しくは、酵母における乳酸産生に適した高発現系に関する。

【0002】

【従来の技術】

組換えDNA技術の進歩により、微生物、カビ、動植物および昆虫などの宿主で外来遺伝子を発現させ、その形質転換体を増殖させることによって、目的遺伝子産物を取得する技術が発展してきた。例えば、酵母などの培養によれば、発酵生産により大量の目的遺伝子産物を産生させることも可能である。

【0003】

これまで、酵母によってL-乳酸を生産させようとする試みはいくつか存在している。ウシ由来の乳酸脱水素酵素(LDH)遺伝子を酵母サッカロマイセス・セレビシエに導入し、L-乳酸を生産させる試みがある(Eri Adahi et al., "Modification of metabolic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate genes for the lac

tic acid fermentation at low pH value", J. Ferment. Bioeng. Vol.86, No.3, 284-289, 1988, Danio Porro et al., "Development of metabolically engineered *Saccaromyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid", Biotechnol. Prog. Vol.11, 294-298, 1995, 特表 2 0 0 1 - 5 1 6 5 8 4 号公報)。しかしながら、いずれの報告においても、L-乳酸の高生産は認められていない。

【0004】

サッカロマイセス・セレビシエにおけるピルビン酸脱炭酸酵素は、ピルビン酸に対して1~1.5 mMの基質親和性 (K_m 値) をもち、複数のアイソザイムを持つことが知られている (Enzyme Hndbook, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1990, EC 4.1.1.1, EC 1.1.1.27)。通常の酵母においては、ピルビン酸脱炭酸酵素1が機能しており、本遺伝子などの破壊が原因でこのタンパク質が発現しない状態となると、ピルビン酸脱炭酸酵素5が機能し、エタノール生産が維持される機構を備えている ("Autoregulation of yeast pyruvate decarboxylase gene expression requires the enzyme but not its catalytic activity", Ines Ebhardt, Hakan Cederberg, Haijuan Li, Stephan Koning, Frank Jordan and Stephan Hohmann, Eur. J. Biochem. Vol.262, 191-201, 1999)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

このように、サッカロマイセス・セレビシエ中でL-乳酸を高生産させる技術は完成していなかった。

本発明の目的は、酵母サッカロマイセス・セレビシエなどのピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子を有する宿主生物中で乳酸を安定的に大量生産させるための技術を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、サッカロマイセス・セレビシエ中での乳酸産生させる場合に発現させる乳酸脱水素酵素 (LDH) について着目して検討したところ、以下の発明を完成した。

すなわち、本発明によれば、以下の手段が提供される。

【0007】

(1) 宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが導入されている形質転換体。

(2) 前記外来タンパク質をコードするDNAは、宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制御可能に導入されている、(1)記載の形質転換体。

(3) 前記宿主生物は、サッカロマイセス属である、(1)または(2)に記載の形質転換体。

(4) 前記宿主生物は、サッカロマイセス・セレビスエある、(1)または(2)に記載の形質転換体。

(5) 前記外来タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログである、(1)～(4)のいずれかに記載の形質転換体。

(6) 宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが導入されており、

前記外来タンパク質をコードするDNAは、宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制御可能に導入されている、形質転換体。

(7) 前記宿主染色体上のプロモーターは、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子プロモーターである、(6)記載の形質転換体。

(8) 前記宿主生物は、サッカロマイセス属である、(6)または(7)に記載の形質転換体。

(9) 前記宿主生物は、サッカロマイセス・セレビスエである、(6)または(7)に記載の形質転換体。

(10) 前記外来タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログである、(6)～(9)のいずれかに記載の形質転換体。

(11) ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログをコードするDNAが、サッカロマイセス属の宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制御可能に導入されている、形質転換体。

(12) 前記宿主は、サッカロマイセス・セレビスエである、(10)記載の形質転換体。

(13) (1)～(12)のいずれかに記載の形質転換体を培養する工程と、
前記工程で得られる培養物から乳酸を分離する工程、
とを備える、乳酸の製造方法。

【0008】

本発明の形質転換体は、宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが導入され、当該外来タンパク質が発現されるようになっている。

ピルビン酸は、エタノール産生に繋がるピルビン酸脱炭酸酵素と乳酸産生を触媒する乳酸脱水素酵素などの共通の基質である。

本形質転換体においては、乳酸脱水素酵素の方がピルビン酸脱炭酸酵素よりもピルビン酸に対する基質親和性が高いので、ピルビン酸脱炭酸酵素によって触媒されるエタノール産生が抑制され、外来の乳酸脱水素酵素による乳酸産生が促進される。これにより、形質転換体による乳酸生産を増大させることができる。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(形質転換体)

形質転換体において発現される外来タンパク質は、乳酸脱水素酵素(LDH)活性を有し、かつ、形質転換しようとする宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素との関係において、その酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備えている。

ここで、LDHは、酵母などの生物の解糖系において、ピルビン酸から乳酸を

産生する反応を媒介する酵素として知られている。ここで、乳酸は、L（+）－乳酸とD（－）－乳酸とを含むが、好ましくは、L（+）－乳酸である。酵母においては、L（+）－乳酸であることが好ましい。L（+）－乳酸は、L（+）－LDHによって産生され、D（－）－乳酸は、D（－）－LDHによって産生される。

【0010】

本発明で用いる外来タンパク質としてLDHを用いることができる。生物の種類に応じてあるいは生体内においても各種同族体が存在する。本発明におけるLDH活性を備えるタンパク質としては、天然由来のLDHの他、化学合成的あるいは遺伝子工学的に人工的に合成されたLDHも包含している。

LDHとしては、好ましくは、酵母などの真核微生物由来であり、より好ましくは、植物、動物、昆虫などの高等真核生物由来であり、さらに好ましくは、ウシを始めとする哺乳類を含む高等真核生物由来である。最も好ましくは、ウシ由来のLDHである。例えば、ウシ由来のLDHとして配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を挙げることができる。

ウシ由来LDHとしては、筋肉由来、心臓由来などのLDHがあり、いずれも使用することができる。なお、酵素番号としては、EC 1. 1. 1. 27を挙げることができる。

【0011】

さらに、本発明における外来タンパク質は、これらのLDHのホモログも包含している。LDHホモログは、天然由来のLDHのアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列でありかつLDH活性を有しているタンパク質、および、天然由来のLDHとアミノ配列の相同性が少なくとも70%、好ましくは80%以上を有しかつLDH活性を有しているタンパク質を含んでいる。

なお、アミノ酸配列における変異の数は、もとのタンパク質の機能が維持できる限り制限されないが、全アミノ酸の70%以内であることが好ましく、より好ましくは、30%以内であり、さらに好ましくは20%以内である。

例えば、配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸の

置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有し、かつLDH活性を有しているタンパク質、あるいは、配列番号1に示すアミノ酸配列との相同性が少なくとも70%、好ましくは80%を有し、かつLDH活性を有するタンパク質は、好ましいホモログである。

【0012】

なお、アミノ酸配列における改変は、改変しようとするアミノ酸配列に、部位特異的変位導入法 (Current Protocols I Molecular Biology edit. Ausubel et al., (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5) 等を用いて、適宜、置換、欠失、挿入、および／または付加変異を導入することにより行うことができる。また、このような改変は、人工的に変異を導入しあるいは合成したものに限られず、人工的な変異処理に基づいてあるいはこれに限られず自然界におけるアミノ酸の変異によっても生じたものも包含される。

【0013】

また、本発明で用いる外来タンパク質は、ピルビン酸に対して高い基質親和性を有していることが好ましい。ここで基質親和性とは、式(1)に示すミカエリス-メンテン (Michaelis-Menten) の式における K_m 値である。

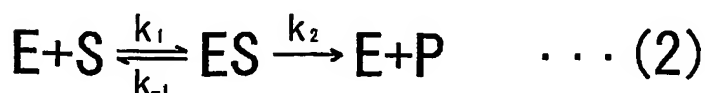
【数1】

$$v_0 = k_2 E_0 [S] / ([S] + K_m) \dots\dots\dots (1)$$

ただし、 v_0 は定常初速度、 $[S]$ は基質濃度、 $[ES]$ は酵素と基質との複合体の濃度、 E_0 は酵素の全濃度、 k_2 は $ES \rightarrow E + S$ の場合の速度定数である。

ミカエリス-メンテンの式は、以下の式(2)に示す基質 S 、酵素 E 、基質-酵素複合体 ES 、および生成物 P との関係に基づいている。 k_1 は、基質 S と酵素 E が複合体 ES を形成するときの平衡定数であり、 k_2 は、複合体 ES から生成物 P と酵素 E とが生成する平衡定数であり、 k_{-1} は、複合体 ES が酵素 E と基質 S とに解離するときの平衡定数である。

【数2】



【 0 0 1 4 】

ここで、定数から K_m は以下の式 (3) で定義することができる。

【数 3】

$$v_0 = k_2 [ES]$$

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_{-1}) [ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_m \quad \dots (3)$$

さらに、式 (4) に示すように、各種濃度で書き換えることができる。

【数 4】

$$K_m = (E_0 - [ES]) [S] / [ES] \quad (4)$$

【 0 0 1 5 】

基質親和性は、例えば、酵素濃度一定下で、基質濃度 $[S]$ と初速度 v_0 との関係を求め、基質濃度を横軸に初速度を縦軸にとったグラフなどから求めることができる。また、Lineweaver-Burkプロットによっても求めることができる。

【 0 0 1 6 】

本発明の外来タンパク質の対ピルビン酸基質親和性は、宿主生物のピルビン酸脱炭酸酵素との関係において、この酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超えていることが好ましい。基質親和性の比較は、好ましくは、温度および pH などの条件を共通とする。温度や pH 条件は、宿主生物におけるこれらの酵素の触媒する環境を考慮して決定することができる。例えば、温度 30 ~ 37℃、pH を 6.0 ~ 7.5 の条件下で両酵素の基質親和性を測定することが好ましい。

【0017】

本外来タンパク質の対ピルビン酸基質親和性は、好ましくは、約1.5 mM以下である。1.5 mMを超えると、宿主生物のもつピルビン酸脱炭酸酵素とピルビン酸とが反応しやすくなるからである。より好ましくは1 mM以下である。さらに好ましくは、0.5 mM以下であり、もっとも好ましくは、0.1 mM以下である。

また、本外来タンパク質の対ピルビン酸基質親和性は、宿主生物のピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かそれよりも高いことが好ましく、宿主生物の当該酵素の当該基質親和性よりも高いことがより好ましい。宿主生物の当該酵素のピルビン酸基質親和性よりも低ければ、宿主生物のピルビン酸脱炭酸酵素とピルビン酸とが反応しやすくなるからである。宿主脱炭酸酵素のピルビン酸基質親和性よりも高いしてしまうからである。

【0018】

本形質転換体においては、このような外来タンパク質をコードするDNAが導入されている。本DNAは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAなど、その由来を問うものではない。

また、本DNAは、LDHをコードする天然由来の塩基配列を有していてもよいし、かかる塩基配列の一部あるいは全体が改変された塩基配列であって、LDH活性を有するタンパク質をコードするものであってもよい。また、LDHホモログをコードする合成あるいは天然由来の塩基配列を有するDNAであってもよい。

【0019】

本発明で使用するDNAは、形質転換しようとする宿主生物において多用されるコドン用法を用いた塩基配列を有することができる。例えば、本DNAは、サッカロマイセス属、とくに、サッカロマイセス・セレピシエにおけるコドン用法を用いて遺伝暗号化された塩基配列を有することができる。

【0020】

なお、DNAは、化学的に合成することもできるし、長鎖DNAの合成方法として知られている藤本らの手法（藤本英也、合成遺伝子の作製法、植物細胞工学

シリーズ7 植物のPCR実験プロトコル、1997、秀潤社、p95-100)を採用することもできる。

【0021】

(DNA構築物)

本外来タンパク質のアミノ酸配列をコードする本DNAを導入して宿主細胞を形質転換して、このDNAによってコードされるタンパク質を発現させることにより、そのLDH活性により宿主細胞において乳酸を産生させることができる。

形質転換にあたっては、本DNAからなるDNAセグメントを、宿主細胞内で発現可能とするDNA構築物を用いる。形質転換のためのDNA構築物の態様としては、特に限定しないでプラスミド(DNA)、バクテリオファージ(DNA)、レトロトランスポゾン(DNA)、人工染色体(YAC、PAC、BAC、MAC等)を、外来遺伝子の導入形態(染色体外あるいは染色体内)や宿主細胞の種類に応じて選択して採用することができる。また、線状あるいは環状の形態を問うものではない。したがって、本DNA構築物は、本DNAの他、これらのいずれかの態様のベクターの構成セグメントを備えることができる。好ましい原核細胞性ベクター、真核細胞性ベクター、動物細胞性ベクター、植物細胞性ベクターは当該分野において周知である。

【0022】

なお、プラスミドDNAとしては、例えば、pRS413、pRS415、pRS416、YCp50、pAUR112またはpAUR123などのYCp型大腸菌-酵母シャトルベクター、pYES32またはYEpl3などのYEpl型大腸菌-酵母シャトルベクター、pRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pAUR101またはpAUR135などのYIp型大腸菌-酵母シャトルベクター、大腸菌由来のプラスミド(pBR322、pBR325、pUC18、pUC19、pUC119、pTV118N、pTV119N、pBluescript、pHSG298、pHSG396又はpTrc99AなどのColE系プラスミド、pACYC177又はpACYC184などのp1A系プラスミド、pMW118、pMW119、pMW218又はpMW219などのpSC101系プラスミド等)、枯草菌由来のプラスミド(例えば、pU

B110、pTP5等)などを挙げる事ができる。ファージDNAとしては、 λ ファージ (Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、 λ gt100、gt11、zap)、 ϕ X174、M13mp18又はM13mp19などを挙げる事ができる。レトロトランスポゾンとしては、Ty因子などを挙げる事ができる。YACとしては、pYACC2などを挙げる事ができる。

【0023】

本DNA構築物を作製するには、本DNAを含むフラグメントなどを適当な制限酵素で切断し、使用するベクターDNAの制限酵素部位あるいはマルチクローニングサイトに挿入などすることによる。

本DNA構築物の第1の態様は、本DNAからなるDNAセグメントを発現可能に連結されるプロモーターセグメントを備えている。すなわち、プロモーターにより制御可能にそのプロモーターの下流側に本DNAセグメントが連結されている。

【0024】

本DNA産物、すなわち、LDH活性を備えるタンパク質の発現にあつては、酵母における発現が好ましいことから、酵母中で発現するプロモーターを使用することが好ましい。かかるプロモーターとしては、例えば、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子プロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーターなどを使用することが好ましい。特に、サッカロマイセス属由来のピルビン酸脱炭酸酵素(1)プロモーターが好ましく、サッカロマイセス・セレビシエ由来のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子プロモーターを利用することがより好ましい。これらのプロモーターは、サッカロマイセス属(セレビシエ)のエタノール発酵経路において高発現されているからである。なお、かかるプロモーター配列は、サッカロマイセス属酵母のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のゲノムDNAを鋳型とするPCR増幅法によって単離することができる。サッカロマイセス・セレビシエ由来の当該プロモーターの塩基配列を、配列番号2に示す。な

お、本DNA構築物におけるプロモーターセグメントには、この配列番号2記載の塩基配列からなるDNAの他、この塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつプロモーター活性を有するDNA、配列番号2で示される塩基配列の全部若しくは一部の配列から調製されたDNAあるいはその相補鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するDNA（換言すれば、当該プロモーターのホモログ）を用いることができる。

【0025】

また、本DNA構築物の他の態様である第2のDNA構築物は、本DNAの他、宿主染色体を相同組換えのためのDNAセグメントを備える。相同組換え用DNAセグメントは、宿主染色体において本DNAを導入しようとするターゲット部位近傍のDNA配列と相同なDNA配列である。相同組換え用DNAセグメントは、少なくとも1個備えられ、好ましくは、2個備えられている。例えば、2個の相同組換え用DNAセグメントを、染色体上のターゲット部位の上流側と下流側のDNAに相同なDNA配列とし、これらのDNAセグメントの間に本DNAを連結することが好ましい。

【0026】

相同組換えにより宿主染色体に本DNAを導入する場合、宿主染色体上のプロモーターにより制御可能に本DNAを導入することができる。この場合、本DNAの導入によって、同時に、本来当該プロモーターによって制御されるべき内在性遺伝子を破壊し、この内在性遺伝子に替えて外来の本DNAを発現させることができる。特に、当該プロモーターが、宿主細胞において高発現プロモーターである場合に有用である。

【0027】

かかる発現系を宿主染色体上に創出するには、宿主染色体において高発現遺伝子をターゲットとし、この遺伝子を制御するプロモーターの下流にプロモーターにより制御を受けるように本DNAを導入するようにすることが好ましい。酵母などのエタノール発酵性微生物を宿主とする場合、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子（特に、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子）をターゲットとし、内在性のピルビン

酸脱炭酸酵素遺伝子プロモーターの制御下にLDH活性タンパク質をコードするDNAを導入することができる。この場合、相同組換え用DNAセグメントは、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のLDHの構造遺伝子領域あるいはその近傍の配列（開始コドンの近傍の配列、開始コドンの上流域の配列、構造遺伝子内の配列などを含む）と相同とすることができる。好ましくは、サッカロマイセス属（特にセレビスエ）を宿主として、この宿主のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子をターゲットとするDNA構築物とする。かかるDNA構築物によれば、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子の破壊とこの構造遺伝子部分のLDHによる置換を一つのベクターで達成することができる。ピルビン酸脱炭酸酵素1は、ピルビン酸からアセトアルデヒドへの付加逆反応を媒介する酵素であり、この遺伝子を破壊することにより、アセトアルデヒドを経たエタノール産生が抑制されることが期待されるとともに、ピルビン酸を基質とするLDHによる乳酸産生が促進されることが期待できる。

【0028】

なお、第1のDNA構築物であっても、宿主染色体との相同組換えのためのDNAセグメントを備えることにより、相同組換え用のDNA構築物とすることができる。第1のDNA構築物にあっては、DNA構築物中のプロモーターセグメントを、宿主染色体との相同組換え用のDNAセグメントに兼用することもできる。例えば、宿主サッカロマイセス・セレビスエに対して、サッカロマイセス・セレビスエ宿主染色体にあるプロモーター、例えば、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子プロモーターをプロモーターセグメントとして有するDNA構築物は、当該遺伝子1をターゲット部位とするターゲティングベクターを構成する。この場合、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子の構造遺伝子領域に対する相同配列を備えることが好ましい。

【0029】

なお、DNA構築物には、ターミネーター他、必要に応じてエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）を連結することができる。選択マーカーとしては、特に限定しないで、薬剤抵抗性遺伝子、栄養要求性遺伝子などを始めと

する公知の各種選択マーカー遺伝子を利用できる。例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等を使用することができる。

【0030】

(DNA構築物による形質転換)

一旦、DNA構築物が構築されたら、適当な宿主細胞に、トランスフォーメーション法や、トランスフェクション法、接合法、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、酢酸リチウム法、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿法、アグロバクテリウム法、PEG法、直接マイクロインジェクション法等の各種の適切な手段のいずれかにより、これを導入することができる。するDNA構築物の導入後、その受容細胞は、選択培地で培養される。

【0031】

宿主細胞は、*Eshrichia coli*、*Bacillus subtilis*などの細菌、サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*)、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの酵母、sf9、sf21等の昆虫細胞、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) などの動物細胞、サツマイモ、タバコなどの植物細胞などとすることができる。好ましくは、酵母などのアルコール発酵を行う微生物あるいは耐酸性微生物であり、例えば、サッカロマイセス・セレビシエなどのサッカロマイセス属を始めとする酵母である。具体的には、サッカロマイセス・セレビシエ IFO2260株や同YPH株である。

【0032】

DNA構築物によって形質転換された形質転換体においては、DNA構築物の構成成分が染色体上あるいは染色体外因子 (人工染色体を含む) 上に存在することになる。なお、DNA構築物が染色体外に維持されている場合、あるいは、ランダムインテグレーションにより染色体に組み込まれている場合には、LDHの基質であるピルビン酸を基質とする他の酵素、例えば、ピルビン酸脱炭酸酵素の遺伝子 (サッカロマイセス属酵母においては、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子)

は、ターゲティングベクターによりノックアウトされていることが好ましい。

上述のDNA構築物であって、相同組換えを達成できるDNA構築物が導入されると、宿主染色体上の所望のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログの下流に当該プロモーターによって制御可能に連結された本DNAであるDNAセグメントが存在することになる。サッカロマイセス属酵母の形質転換体にあつては、宿主染色体上において、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子プロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログの下流に当該プロモーターによって制御可能に本DNAを備えることが好ましい。

また、通常、相同組換え体における本DNAの下流側には、選択マーカー遺伝子や、破壊された構造遺伝子の一部（DNA構築物上の相同配列に対応する部位）が存在する。

【0033】

なお、所望のプロモーター下に本DNAが導入されたか否かの確認は、PCR法やサザンハイブリダイゼーション法により行うことができる。例えば、形質転換体からDNAを調製し、導入部位特異的プライマーによりPCRを行い、PCR産物について、電気泳動において予期されるバンドを検出することによって確認できる。あるいは蛍光色素などで標識したプライマーでPCRを行うことでも確認できる。これらの方法は、当業者において周知である。

【0034】

（乳酸の製造）

DNA構築物が導入されて得られる形質転換体を培養することにより、培養物中に外来遺伝子の発現産物である乳酸が生成する。培養物から乳酸を分離する工程を実施することにより、乳酸を得ることができる。なお、本発明において培養物とは、培養上清の他、培養細胞あるいは菌体、細胞若しくは菌体の破砕物を包含している。

本発明の形質転換体の培養にあたっては、形質転換体の種類に応じて培養条件を選択することができる。このような培養条件は、当業者においては周知である。

大腸菌や酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化可能な炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれも使用することができる。炭素源としては、グルコース、フルクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコールを用いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩またはその他の含窒素化合物の他、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等を用いることができる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウムなどを用いることができる。

【 0 0 3 5 】

培養は、通常、振とう培養または通気攪拌培養等の好気条件下、30℃で6～24時間行う。培養期間中、pHは2.0～6.0に保持することが好ましい。また、pHの調整は、無機あるいは有機酸、アルカリ溶液等を用いて行うことができる。培養中は、必要に応じてアンピシリン、テトラサイクリンなどの構成物質を培地に添加することができる。

【 0 0 3 6 】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、DMEM培地またはこれらの培地にウシ胎児血清などを添加した培地を用いることができる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1～30日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

【 0 0 3 7 】

培養終了後、培養物から遺伝子産物を分離するには、通常のタンパク質の生成手段などを使用することができる。例えば、形質転換細胞内に生産された場合は、常法により菌体を超音波破壊処理、摩砕処理、加圧破碎などに細胞を破壊して、遺伝子産物を細胞と分離することができる。この場合、必要に応じてプロテア

ーゼを添加する。また、培養上清に遺伝子産物が生産された場合には、この溶液を、ろ過、遠心分離などにより固形分を除去し、必要によりプロタミン処理などにより核酸を除去する。

【0038】

これらの粗抽出画分に対して、硫酸、アルコール、アセトン等などを添加し分画し、沈殿物を採取し、粗タンパク質溶液を得る。このタンパク溶液を、各種クロマトグラフィー、電気泳動などにかけて精製酵素標品を得ることができる。たとえば、セファデックス、ウルトラゲルもしくはバイオゲルなどを用いるゲルろ過、イオン交換体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲルなどを用いる電気泳動法、アフィニティクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を用いる分画法を適宜選択し、又はこれらの組み合わせることにより、精製された目的の遺伝子産物を取得することができる。なお、精製された遺伝子産物が有するアミノ酸配列は、公知のアミノ酸分析法により行うことができる。

上記した培養法、精製法は、一例であってこれに限定する趣旨ではない。

【0039】

【実施例】

以下に、本発明の具体例を記載するが、本発明は以下の具体例に限定する趣旨ではない。

【0040】

(実施例1：L-乳酸脱水素酵素遺伝子のDNA配列の設計)

高等真核生物であるウシ由来のタンパク質であるL-乳酸脱水素酵素を、酵母サッカロマイセス・セレビシエ属において効率的に生産するために、ウシ由来L-乳酸脱水素酵素のアミノ酸配列をコードするDNAに対して、以下の項目を設計指針として、天然にない新規な遺伝子配列を設計した。

- 1) サッカロマイセス・セレビシエにおいて多用されているコドンを用いた。
- 2) 開始コドンをはさんでコザック配列 (ANNATGG) を付加した。
- 3) mRNAの不安定配列や繰り返し配列をできる限り排除した
- 4) 全領域にわたってGC含量の偏りに差がでないようにした。
- 5) 設計した配列中に遺伝子クローニングに不適当な制限酵素部位ができない

ようにした。

6) 染色体導入型ベクターに組み込むための両末端に有用な制限酵素EcoRI、XhoI、AflIII部位を付加した。

酵母におけるコドンの使用頻度は、コドンユーセージデータベース (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) から得られるサッカロマイセス・セレビシエのコドンユーセージを図2に示す。この図において特定アミノ酸に対応して多用されているコドン进行特定した(下線をしたコドン)。

【0041】

図1に示すコドンユーセージにおける多用コドンの適用の他、上記2)～5)の設計指針に基づいて得られたLDH活性を有するタンパク質をコードする新規なDNA配列(999bp)(以下、LDHKCB遺伝子と称す。)を配列番号3に示す。また、配列番号3に示すDNA配列とその開始コドンの上流側および終止コドンの下流側とを含むDNA配列(1052bp)(以下、LDHKCB配列と称す。)を配列番号4に示す。

【0042】

配列番号3に記載のDNA配列においては、メチオニン以外の全てのアミノ酸において、もとのDNA配列で使したのと異なるコドンを使用していた。なお、新たに採用されたコドンは、全て図1に示す多用コドンであった。さらに、もとのウシ由来のLDH遺伝子とLDHKCB遺伝子とについて、コンピューターによるホモロジー解析を行った結果を図2に示す。図2から明らかなように、DNA配列のほぼ全域にわたって多数の置換を要することがわかった。

【0043】

(実施例2：LDHKCB配列の全合成)

本実施例では、長鎖DNAの合成方法として知られている藤本らの手法(藤本英也、合成遺伝子の作製法、植物細胞工学シリーズ7 植物のPCR実験プロトコール、1997、秀潤社、p95-100)を用いた。この方法の原理は、100MER程度のオリゴヌクレオチドプライマーを3'末端に10～12mer程度のオーバーラップを持つように作製し、お互いのオリゴヌクレオチドプライマーのオーバーラップ領域を利用して、欠損部分を伸張させ、さらに両末端のプラ

イマーを用いてPCRを行うことによって増幅するというものである。この操作を順次繰り返し、目的とする長鎖DNAを合成する。PCR増幅装置には、Gene Amp PCR system 9700 (PE, Applied Biosystems) を使用した。

具体的には、最初に連結させたい2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを混合し、KOD-plus-DNA polymerase (東洋紡) 存在下で、96℃、2分、68℃2分、54℃2分、72℃30分の反応条件でDNA伸張反応を行った。次に、本試料の1/10量を鋳型にして、両末端のプライマー存在下で、96℃2分後、(96℃30秒→55℃30秒→72℃90秒)を25サイクル行い、その後4℃とするPCR反応をおこなった。反応におけるバッファ、dNTPmixなどは、DNA polymeraseに附属のものを使用した。

一連のオーバーラップPCR法を図3に従って順次行っており、最終目的とする遺伝子断片を作製した。図3に示す各種プライマー (BA、B01、BB、B02、BC、B03、BD、B04、BE、B05、BF、B06、BG、B07、BH、B08、BI、B09、BJ、B10、BK、B11、BL、B12、BM、B13、BN、B14) の全28種のプライマーのDNA配列を配列番号5～32にそれぞれ示す。合成したLDHKCB配列について、塩基配列を確認した後、EcoRIにて制限酵素処理し、同様にEcoRIにて酵素処理したpCR2.1 TOPO Vector (Invitrogen) に常法により連結した。このベクターをpBTRP-LDHKCBベクターと称した。

【0044】

(実施例3：酵母染色体導入用ベクターの構築)

実施例2において全合成したLDHKCB配列を用いて、酵母染色体導入型ベクターを構築した。このベクターを、pBTRP-PDC1-LDHKCBと称し、このプラスミドマップを図4に示す。

1. pBTRP-PDC1-LDHKCB構築のためのPDC1P断片の単離

PDC1P断片は、サッカロマイセス・セレビシエYPH株 (Stratagene社) のゲノムDNAを鋳型として使用したPCR増幅法によって単離を行った。

【0045】

サッカロマイセス・セレビスエYPH株のゲノムDNAは、ゲノム調製キットであるFast DNA Kit (Bio 101社) を用い、詳細は、附属のプロトコールに従い、調製した。DNA濃度は分光光度計Ultraviolet 3000 (Amersham Pharmacia Biotech社) にて測定した。

【0046】

PCR反応には、増幅酵素として、増幅断片の正確性が高いとされるPyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を使用した。上記手法にて調製したサッカロマイセス・セレビスエYPH株のゲノムDNA 50 ng/サンプル、プライマーDNA 50 pmol/サンプル、及びPyrobest DNA polymerase 0.2 ユニット/サンプルを合計で50 μ l の反応系に調製した。反応溶液を、PCR増幅装置 Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystem社) によってDNA増幅を行った。PCR増幅装置の反応条件は、96℃2分の後、(96℃30秒→55℃30秒→72℃90秒)を25サイクル行い、その後4℃とした。PDC1プライマーの増幅断片を1%TBEアガロースゲル電気泳動にて遺伝子増幅断片の確認を行った。なお反応に使用したプライマーDNAは、合成DNA (サワデーテクノロジー社) を用い、このプライマーのDNA配列は以下の通りであった。

【0047】

・PDCIP-LDH-U (31mer, T_m値58.3℃) 末端に制限酵素BamHIサイトを付加

: ATA TAT GGA TCC GCG TTT ATT TAC CTA TCT C (配列番号33)

・PDC1P-LDH-D (31mer, T_m値54.4℃) 末端に制限酵素EcoRIサイトを付加

: ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT GAC TGT G (配列番号34)

【0048】

2. プロモーター及び目的遺伝子を含む組換えベクターの構築

サッカロマイセス・セレビスエ由来のビルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子 (PDC

1) プロモーター配列の制御下で、目的遺伝子としてウシ由来のL-乳酸脱水素酵素遺伝子(LDH遺伝子)を使用した。

【0049】

本組換えベクター構築のために新たに構築した染色体導入型ベクターをpBT-rp-PDC1-LDHKCBと名付けた。以下に本ベクター構築例の詳細を記す。なお本実施例の概要を図5～8に示す。但し、ベクター構築の手順はこれに限定されるものではない。

ベクターの構築にあたって、必要な遺伝子断片であるPDC1遺伝子のプロモーター断片(PDC1P)971bpと、PDC1遺伝子下流領域断片(PDC1D)518bpは、上述のように、サッカロマイセス・セレビシエYPH株のゲノムDNAを鋳型として使用したPCR増幅法によって単離を行った。PCR増幅の手順は上記の通りであるが、PDC1遺伝子下流領域断片の増幅には、以下のプライマーを使用した。

・PDC1D-LDH-U (34mer、T_m値55.3℃) 末端に制限酵素XhoIサイトを付加

: ATA TAT CTC GAG GCC AGC TAA CTT CTT GGT
CGA C (配列番号35)

・PDC1D-LDH-D (31mer、T_m値54.4℃) 末端に制限酵素ApaIサイトを付加

: ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT GAC TGT
G (配列番号36)

【0050】

上記反応にて取得したPDC1P及びPDC1D各遺伝子増幅断片をそれぞれ、エタノール沈殿処理によって精製した後、PDC1P増幅断片を制限酵素BamHI/EcoRI及びPDC1D増幅断片を制限酵素XhoI/ApaIにて制限酵素反応処理を行った。なお、以下に用いた酵素類はすべて宝酒造社製のものを用いた。また、エタノール沈殿処理、制限酵素処理の一連操作の詳細なマニュアルはMolecular Cloning A Laboratory Manual second edition (Maniatis et al., Co

ld Spring Harbor Laboratory press. 1989
)に従った。

【0051】

ベクターの構築における一連の反応操作は、一般的なDNAサブクローニング法に準じて行った。すなわち、制限酵素BamHI/EcoRI（宝酒造社）及び脱リン酸化酵素Alkaline Phosphatase（BAP、宝酒造社）を施したpBluescript II SK+ベクター（東洋紡社）に、上記PCR法にて増幅し制限酵素処理を施したPDC1P断片をT4 DNA Ligase反応によって連結させた（図5上段）。T4 DNA Ligase反応には、LigaFast Rapid DNA Ligation System（プロメガ社）を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。

【0052】

次にLigation反応を行った溶液を用いて、コンピテント細胞への形質転換を行った。コンピテント細胞は大腸菌JM109株（東洋紡社）を用い、詳細は付属のプロトコールに従って行った。得られた培養液は抗生物質アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有したLBプレートにまいて一晚培養した。生育したコロニーにつき、インサート断片のプライマーDNAを用いたコロニーPCR法による確認、及びミニプレップによるプラスミドDNA調製溶液に対する制限酵素処理による確認を行い、目的とするベクターpBPDC1Pベクターを単離した（図5中段）。

【0053】

ついで、図5の中段に示すように、株式会社豊田中央研究所によって構築されたpBTOPO-LDHKCBベクターを制限酵素EcoRI処理及び末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理することで得られるLDHKCB遺伝子断片を、同じく制限酵素EcoRI処理、末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理を行ったpBPDC1Pベクター中に、上述と同様の操作でサブクローニングを行い、pBPDC1P-LDHKCBベクターを作製した（図5下段）。

【0054】

一方、図6に示すように、トヨタ自動車（株）によって構築されたpYLD1ベクターを制限酵素EcoRI/AatII処理及び末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理することで得られるLDH遺伝子（ビフィドバクテリウム・ロンガム由来）断片を、同じく制限酵素EcoRI処理、末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理を行ったpBPDC1Pベクター中に、上述と同様の操作でサブクローニングを行い、pBPDC1P-LDH1ベクターを作製した（図6）。なお、上記のpYLD1ベクターは大腸菌に導入され（名称：「E. coli pYLD1」）、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1）に、受託番号FERM B P-7423としてブダベスト条約に基づき国際寄託されている（原寄託日：平成11（1999）年10月26日）。

【0055】

続いて、図7に示すように、このベクターをXhoI/ApaI処理し、同様に制限酵素処理を施した増幅PDC1D断片を連結させてpBPDC1P-LDHベクターを作製した（図7上段）。最後にpBPDC1P-LDHIIベクターをEcoRV処理したものに、pRS404ベクター（Stratagene社）をAatII/SspI処理、T4 DNA polymerase処理して得られたTrpマーカ断片を連結させて、pBTrp-PDC1-LDHベクターを構築した。

【0056】

次に、図8に示すように、pBPDC1P-LDHKCBベクターをApaI/EcoRIにて制限酵素処理し、一方、pBTrp-PDC1-LDHベクターを、制限酵素ApaIおよびStuIで処理したTrpマーカを含む断片に処理し、増幅させた断片を連結させて、最終コンストラクトである染色体導入型pBTrp-PDC1-LDHKCBベクターを構築した。

【0057】

構築した染色体導入型pBTrp-PDC1-LDHKCBベクターの確認の為に塩基配列決定を行った。塩基配列解析装置としてABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystem

s 社) を使用し、試料の調製法、及び機器の使用方法等の詳細は本装置付属のマニュアルに従った。試料となるベクターDNAはアルカリ抽出法により調製したものを、これをGFX DNA Purification kit (Amershan Pharmacia Biotech社) にてカラム精製した後、分光光度計Ultro spec 3000 (Amershan Pharmacia Biotech社) にてDNA濃度を測定したものをを用いた。

【0058】

(実施例4：酵母の形質転換)

酵母への遺伝子導入法は、Itoらの手法 (Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations J. Bacteriol. Vol.153, p163-168) に従った。すなわち、宿主である酵母IFO2260株 (社団法人発酵研究所に登録されている菌株) のトリプトファン合成能を欠損した株を、10ml YPD培地にて30℃で対数増殖期まで培養を行い、集菌およびTEバッファによる洗浄を行った。次に、0.5ml TEバッファと0.5ml 0.2Mの酢酸リチウムを加え、30℃にて1時間の振とう培養を行った後に、実施例3の手法を用いて構築した染色体導入型ベクター-pBTrp-PDC1-LDHKCBベクターを、制限酵素ApaIおよびSacI (いずれも宝酒造) で処理して、これを添加した。

【0059】

本酵母懸濁液を30℃で30分振とう培養後、150 μ lの70%ポリエチレングリコール4000 (和光純薬) を加え、よく攪拌した。さらに、30℃にて1時間振とう培養した後、42℃にて5分間ヒートショックを与え、菌体を洗浄した後、200 μ lの水に懸濁したものをトリプトファン選択培地に塗抹した。

【0060】

得られたコロニーを新たなトリプトファン選択培地に画線培養し、安定性が確認できた選抜株について、遺伝子導入の有無をPCR解析によって確認した。PCRに鋳型として用いる酵母のゲノムDNAは、シングルコロニーを2ml YPD培地で一晩振とう培養を行った後、集菌し、50mM Tris-HCl 500 μ lおよびガラスビーズ (425~600 μ m, Acid washed, SI

GMA) を加え、4℃で15分間ボルテックスを行うことにより調製した。本溶液の上清を用いてエタノール沈殿を行い、滅菌水50 μ lに溶解した、調製したゲノムDNA5 μ lを鋳型として、50 μ lの反応系でPCRを行った。DNA増幅酵素としては、EX Taq DNA Polymerase (宝酒造) を用い、PCR増幅装置Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems) を使用した。PCR増幅装置の反応条件は、96℃2分の後、(96℃30秒→55℃30秒→72℃90秒)を30サイクル行い、その後4℃とした。使用したプライマーの配列は以下の通りであった。

LDH-KCB-U: TGG TTG ATG TTA TGG AAG AT (20mer) (配列番号37)

LDH-KCB-D: GAC AAG GTA CAT AAA ACC CAG (21mer) (配列番号38)

PDC1P-U3: GTA ATA AAC ACA CCC CGC G (19mer) (配列番号39)

【0061】

安定したトリプトファン合成能を有し、かつ、これらのプライマーのもとでPCR増幅が確認できたものを、LDHKCB遺伝子が適切に導入された形質転換株であると判断した。本実施例においては、かかる形質転換株として、KCB-2.7株、KCB-210株、およびKCB-211株の3種の菌株を取得することができた。これら酵母サッカロマイセス・セレビシエ形質転換体のゲノム染色体上の構造を図9に示す。

【0062】

(実施例5: 形質転換体におけるL-乳酸生産量の測定)

作製した3種の形質転換株について発酵試験を行った。前培養として、グルコース濃度2%のYPD液体培地で一晚培養を行い、これを集菌および洗浄後、グルコース濃度15%のYPD液体培地に菌体濃度が1% (0.5g/50ml) になるように植菌し、30℃の静置培養にて数日間発酵を行った。本発酵液を24時間ごとに採取し、溶液中に含まれるL-乳酸量を想定した。生産量の測定は

、バイオセンサBF-4（王子計測機器）を用い、測定方法の詳細は、附属の取り扱い説明書に従った。

【0063】

グルコース濃度15%で発酵3日目における培養液中のL-乳酸量およびエタノール量を測定した結果を図10および表1に示す。また、KCB-27株については、0～5日目のL-乳酸量とエタノール量との経緯を図11と表2に示す。

【表1】

株の種類	生産量(%)	
	乳酸	エタノール
TD01	0	7.34
KCB-27	4.92	5.01
KCB-210	4.78	5.14
KCB-211	4.57	5.26

【表2】

株の種類	生産量(%)	経過日数			
		0	1	3	5
TD01	グルコース	15	1.84	0	0
	乳酸	0	0	0	0
	エタノール	0	6.69	7.21	7.38
KCB-27	グルコース	15	2.2	0	0
	乳酸	0	3.01	4.73	4.92
	エタノール	0	4.69	5.11	5.06

LDHKCB遺伝子が導入された形質転換体（KCB-27株、KCB-210株、KCB-211株）では、それぞれLDHKCB遺伝子が1コピーしか導入されていないにもかかわらず、培養液1Lあたり、4.5～5.0%（45.0～50.0g）のL-乳酸生産が認められた。一方、エタノール生産量は5%となり、親株よりも2.5%程度減少していた。

本結果は、過去に報告されているサッカロマイセス・セレビシエにおけるL-乳酸生産と比較して飛躍的な生産量の増大であることは明らかであった。また、かかる生産量の増大は、酵母由来のピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性よりも、同等かあるいは高い基質親和性を有するLDHを導入したことによ

るものと考えられる。また、染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子のプロモーターの制御下に導入したことによるものと考えられる。

以上の結果からすると、1 コピーによってもかかる生産量の増大を得られることから、2 コピー以上が導入された場合には、さらなる生産量の増大を確保できることが推測される。

【 0 0 6 4 】

【発明の効果】

本発明によれば、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子を有する宿主生物中で乳酸を安定的に大量生産させるための技術を提供することができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Toyota Chuo Kenkyusho

Toyota Jidosha Kabushiki Kaisha

<120> Lactate High-expression system and Use thereof

<130> 010770(P01-3840)

<140>

<141>

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 332

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 1

Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu Lys Glu Glu

1

5

10

15

His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly Ala Val Gly

20

25

30

Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala Asp Glu Val

35

40

45

Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Glu Met Met Asp

50

55

60

Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly

65

70

75

80

Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr Ala

85

90

95

Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln Arg

100

105

110

Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr Ser

115

120

125

Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr

130

135

140

Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly

145

150

155

160

Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly Glu

165

170

175

Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly Glu

180

185

190

His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala Gly

195

200

205

Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp Lys

210

215

220

Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr Glu

225

230

235

240

Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser Val

245

250

255

Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro

260

265

270

Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val Phe

275

280

285

Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val Val
 290 295 300

Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser Ala
 305 310 315 320

Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe
 325 330

<210> 2

<211> 971

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

aagggtagcc tccccataac ataaactcaa taaaatatat agtcttcaac ttgaaaaagg 60
 aacaagctca tgcaaagagg tggtagccgc acgccgaaat gcatgcaagt aacctattca 120
 aagtaatatc tcatacatgt ttcatgaggg taacaacatg cgactgggtg agcatatgct 180
 ccgctgatgt gatgtgcaag ataaacaagc aagacggaaa ctaacttctt cttcatgtaa 240
 taaacacacc ccgcgtttat ttacctatct ttaaacttca acaccttata tcataactaa 300
 tatttcttga gataagcaca ctgcacccat accttctta aaagcgtagc ttccagtttt 360
 tggtaggttcc ggcttccttc ccgattccgc ccgctaaacg catatttttg ttgcctggtg 420
 gcatttgcaa aatgcataac ctatgcattt aaaagattat gtatgctctt ctgacttttc 480
 gtgtgatgaa gctcgtggaa aaaatgaata atttatgaat ttgagaacaa ttctgtgttg 540
 ttacggtatt ttactatgga ataattaatc aattgaggat tttatgcaaa tatcgtttga 600
 atatttttcc gaccctttga gtacttttct tcataattgc ataatatgt ccgctgcccc 660
 tttttctggt agacggtgtc ttgatctact tgctatcggt caacaccacc ttattttcta 720
 actatttttt ttttagctca tttgaatcag cttatggtga tggcacattt ttgcataaac 780

ctagctgtcc tcgttgaaca taggaaaaaa aaatatatta acaaggctct ttcactctcc 840
 ttgcaatcag atttgggttt gticccttta ttttcatatt tcttgtcata ttcctttctc 900
 aattattatt ttctactcat aaccacacgc aaaataacac agtcaaatca atcaaagatc 960
 cccaattct c 971

<210> 3

<211> 999

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Modified DNA
 coding lactate dehydrogenase

<400> 3

atggctactt tgaaagatca attgattcaa aatttgttga aagaagaaca tgttccacaa 60
 aataaaatta ctattgttgg tgttgggtgct gttagtatgg ctgtgtctat ttctattttg 120
 atgaaagatt tggctgatga agttgctttg gttgatgtta tggaagataa attgaaaggt 180
 gaaatgatgg atttgcaaca tggttctttg tttttgagaa ctccaaaaat tgtttctggt 240
 aaagattata atgttactgc taattctaga ttggttatta ttactgctgg tgctagacaa 300
 caagaagggtg aatctagatt gaatttgggt caaagaaatg ttaatatatt taaatttatt 360
 attccaaata ttgttaaata ttctccaaat tgtaaattgt tggttgtttc taatccagtt 420
 gatattttga cttatgttgc ttggaaaatt tctggttttc caaaaaatag agttattggt 480
 tctggttgta atttggttgc tgctagattt agatatttga tgggtgaaag attgggtggt 540
 catccattgt cttgtcatgg ttggattttg ggtgaacatg gtgattcttc tgttccagtt 600
 tggctctggtg ttaatgttgc tgggtgttct ttgaaaaatt tgcattccaga attgggtact 660
 gatgctgata aagaacaatg gaaagctgtt cataaacaag ttgttgattc tgcttatgaa 720
 gttattaaat tgaaagggtta tacttcttgg gctattgggt tgtctgttgc tgatttggct 780

gaatctatta tgaaaaattt gagaagagtt catccaattt ctactatgat taaaggtttg 840
 tatggtatta aagaagatgt ttttttgtct gttccatgta ttttgggtca aaatggtatt 900
 tctgatgttg ttaaagttac tttgactcat gaagaagaag cttgtttgaa aaaatctgct 960
 gatactttgt ggggtattca aaaagaattg caattttaa 999

<210> 4

<211> 1052

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Modified DNA
 coding lactate dehydrogenase

<400> 4

acagaattca caatggctac tttgaaagat caattgattc aaaatttggt gaaagaagaa 60
 catgttccac aaaataaaat tactattggt ggtgttggtg ctgttggtat ggcttgtgct 120
 atttctatatt tgatgaaaga tttggctgat gaagttgctt tggttgatgt tatggaagat 180
 aaattgaaag gtgaaatgat ggatttgcaa catggttctt tgtttttgag aactccaaaa 240
 attgtttctg gtaaagatta taatgttact gctaattcta gattggttat tattactgct 300
 ggtgctagac aacaagaagg tgaatctaga ttgaatttgg ttcaaagaaa tgtaaatatt 360
 tttaaattta ttattccaaa tattgttaaa tattctccaa attgtaaatt gttggttggt 420
 tctaattccag ttgatatttt gacttatggt gcttggaataa tttctggttt tccaaaaaat 480
 agagttattg gttctgggtg taatttggat tctgctagat ttagatatatt gatgggtgaa 540
 agattgggtg ttcattccatt gtcttgtcat ggttggattt tgggtgaaca tggtgattct 600
 tctgttccag tttggtctgg tgtaaatggt gctgggtgtt ctttgaaaaa ttgcatcca 660
 gaattgggta ctgatgctga taaagaacaa tggaaagctg ttcataaaca agttgttgat 720
 tctgcttatg aagttattaa attgaaaggt tatacttctt gggctattgg tttgtctggt 780

gctgatttgg ctgaatctat tatgaaaaat ttgagaagag ttcattccaat ttctactatg 840
 attaaagggtt tgtatgggtat taaagaagat gtttttttgt ctgttccatg ttttttgggt 900
 caaaatggta tttctgatgt tgttaaagtt actttgactc atgaagaaga agcttgtttg 960
 aaaaaatctg ctgatacttt gtgggggtatt caaaaagaat tgcaatttta ataactcgag 1020
 cttggttgaa cacgttgcca aggcttaagt ga 1052

<210> 5

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

acagaattca caatggctac tttgaaagat caattgattc aaaatttggtt gaaagaagaa 60
 catgttccac aaaataaaaat tactattggtt ggtgttggtg 100

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

acagaattca caatggctac

20

<210> 7

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

atgataacaa ccacaaccac gacaaccata ccgaacacga taaagataaa actactttct 60
aaaccgacta cttcaacgaa accaactaca ataccttcta 100

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

atgataacaa ccacaaccac

20

<210> 9

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

tggttgatgt tatggaagat aaattgaaag gtgaaatgat ggatttgcaa catggttctt 60
tgtttttgag aactccaaaa attgtttctg gtaaagatta 100

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

tggttgatgt tatggaagat 20

<210> 11

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

taacaaagac catttctaata attacaatga cgattaagat ctaaccaata ataatgacga 60
ccacgatctg ttgttcttcc acttagatct aacttaaacc 100

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

taacaaagac catttctaata a 21

<210> 13

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

tgaatctaga ttgaatttgg ttcaaagaaa tgtaatat tttaaattta ttattccaaa 60
tattgttaaa tattctccaa attgtaaatt gttggttgtt 100

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

tgaatctaga ttgaatttgg t 21

<210> 15

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

taacatttaa caaccaacaa agattaggtc aactataaaa ctgaatacaa cgaacctttt 60
aaagacacaaa aggtttttta tctcaataac caagaccaac 100

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

taacatttaa caaccaacaa a

21

<210> 17

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

agagttattg gttctggtg taatttggat tctgctagat ttagatattt gatgggtgaa 60

agattgggtg ttcattccatt gtcttgtcat ggttgattt

100

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

agagttattg gttctggtg t

21

<210> 19

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

cagaacagta ccaacctaaa acccacttgt accactaaga agacaaggtc aaaccagacc 60
acaattacaa cgaccacaaa gaaacttttt aaacgtaggt 100

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

cagaacagta ccaacctaaa a

21

<210> 21

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

ctttgaaaaa tttgcatcca gaattgggta ctgatgctga taaagaacaa tggaaagctg 60

ttcataaaca agttgttgat tctgcttatg aagttattaa 100

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 22

ctttgaaaaa tttgcatcca g

21

<210> 23

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

agacgaatac ttcaataatt taactttcca atatgaagaa cccgataacc aaacagacaa 60
cgactaaacc gacttagata atacttttta aactcttctc 100

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 24

agacgaatac ttcaataatt t 21

<210> 25

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 25

tatgaaaaat ttgagaagag ttcacccaat ttctactatg attaaagggt tgtatgggtat 60
taaagaagat gtttttttgt ctgttccatg ttttttgggt 100

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 26

atgaaaaaatt tgagaagagt 20

<210> 27

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 27

gacaaggtac ataaaaccca gttttacat aaagactaca acaatttcaa tgaaactgag 60
tactttcttct tcgaacaaac ttttttagac gactatgaaa 100

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 28

gacaaggtac ataaaaccca g 21

<210> 29

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 29

aaaaaatctg ctgatacttt gtgggggtatt caaaaagaat tgcaatttta ataactcgag 60

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 30

aaaaaatctg ctgatacttt g

21

<210> 31

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 31

acgttaaaat tattgagctc gaaccaactt gtgcaacggt tccgaattca ct

52

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 32

acgttaaaat tattgagctc g

21

<210> 33

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 33

atatatggat ccgcgtttat ttacctatct c

31

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 34

atatatgaat tctttgattg atttgactgt g

31

<210> 35

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 35

atatatctcg aggccagcta acttcttggt cgac

34

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 36

atatatgaat tctttgattg atttgactgt g

31

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 37

tggttgatgt tatggaagat

20

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 38

gacaaggtac ataaaaacca g

21

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 39

gtaataaaca caccgccg

19

【図面の簡単な説明】

【図 1】

サッカロマイセス・セレビシエにおけるコドン用法と使用頻度を示す図である。

【図 2】

ウシ由来のLDHの塩基配列とこれを改変設計した塩基配列とのホモロジー解析結果を示す図である。上段がウシ由来のLDH塩基配列であり、下段が改変塩基配列であり、改変塩基配列においてウシ由来の塩基配列と異なる塩基が記号（A，T，CあるいはG）で記載されている。

【図 3】

実施例 1 で用いたPCRによる長鎖DNA合成に使用したプライマー構成と、合成ステップ（ステップ 1 ～ 4）を示す図である。

【図 4】

構築されたベクター pBTrp-PDC1-LDHKCB のプラスミドマップを示す図である。

【図 5】

図 5 に示すベクターの構築工程の一部を示す図である。

【図 6】

pBTrp-PDC1-LDH の構築工程の一部を示す図である。

【図 7】

pBTrp-PDC1-LDH の構築工程の一部を示す図である。

【図 8】

図 5 に示すベクターの構築工程の一部（最終工程）を示す図である。

【図 9】

実施例において得られた形質転換体における染色体DNA上のターゲット部位の構造変化を示す図である。

【図 1 0】

実施例における乳酸生産量とエタノールを示す図である。

【図 1 1】

実施例における乳酸生産量とエタノール生産量との経緯を示す図である。

【書類名】 図面

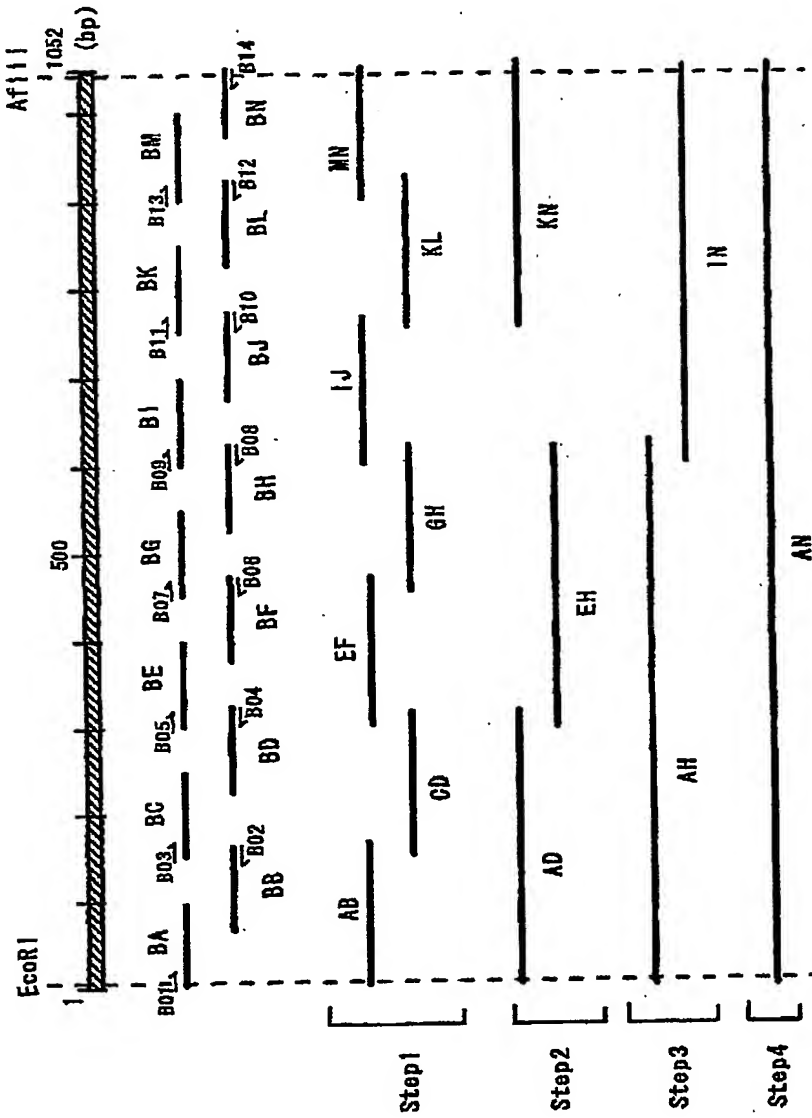
【图 1】

Phe	<u>UUU</u>	26.0 (146412)	<u>UCU</u>	23.6 (132621)	<u>UAU</u>	18.8 (105557)	<u>UGU</u>	8.0 (44797)
	<u>UUC</u>	18.2 (102353)	<u>UCC</u>	14.2 (79920)	<u>UAC</u>	14.7 (82477)	<u>UGC</u>	4.7 (26363)
	<u>UUA</u>	26.4 (148212)	<u>UCA</u>	18.8 (105618)	<u>UAA</u>	1.0 (5537)	<u>UGA</u>	0.6 (3456)
	<u>UUG</u>	27.1 (152577)	<u>UCG</u>	8.6 (48192)	<u>UAG</u>	0.5 (2629)	<u>UGG</u>	10.3 (58084)
Leu								
Ile								
Met								
Val								

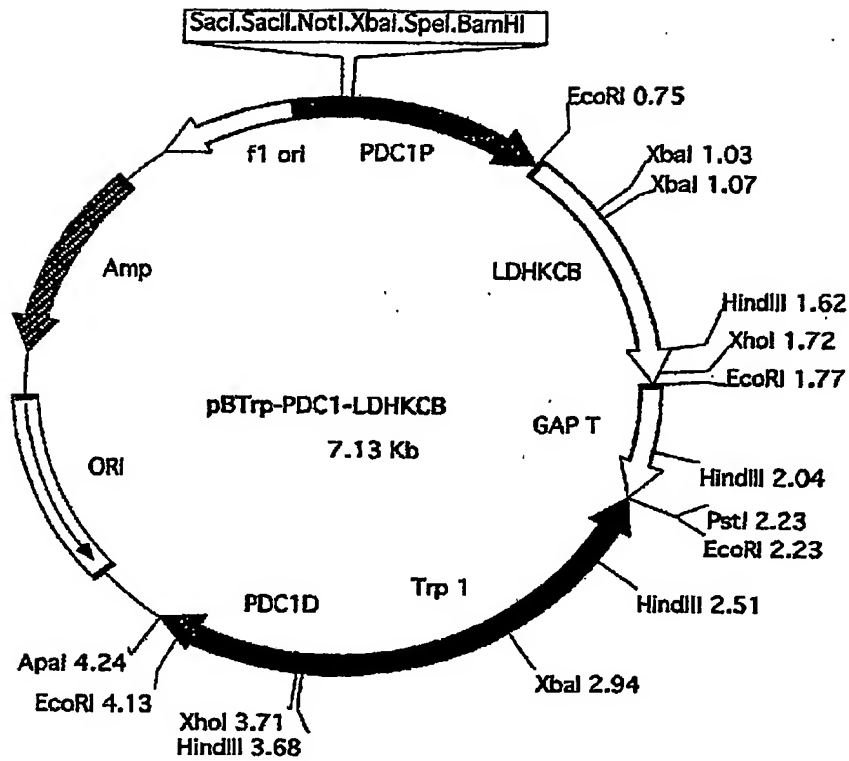
【図 2】

Bovine LDH modified LDH KCB	1	ATGSCAACTCTCAAGCATCAGCTGATTGABAATCTTCTTAAGGAAGAACATGTCCCCAG	60
	1T...T.G..A....AT.....A...T.G..G..A.....T...A..A	60
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	61	AATAAGATTACAATTGTTGGGGTTGGTGGTGTGGCATGGCGTGGCCATGAGTATGTTA	120
	61A....T.....T.....T.....T.....T...TTC...T..G	120
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	121	ATGAAGGACTTGGCAGATGAAGTTGCTCTTGTGATGTCATGGAAGATAAACTGAAGGGA	180
	121A..T....T.....T.G.....T.....T....A..T	180
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	181	GAGATGATGATCTCCAACATGGCAGCGCTTTGCTTAGAAGACCAAAAATGTCTCTGGC	240
	181A.....T.G.....TTCIT..G...TT.G.....T.....T	240
		** *	
Bovine LDH modified LDH KCB	241	AAAGACTATAATGTGACAGGAAACTCGAGCGTGGTTATTATCAGAGCTGGGBCACGTCA	300
	241T.....T..T..T..T..T..AT.....T..T....T..TA..A..A	300
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	301	CAASAGGAGAGAGCGGTCTGAATTTGGTCCAGCGTAACGTGAACATGTTAAATTCATC	360
	301A..T..ATCTA..AT.....T..AA..A..T..T..T.....T..T	360
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	361	ATTGCTAATATTGTAAATACAGCGCAAAATTGCAAGTTGCTTGTGTTTCCAATCCAGTC	420
	361A.....T.....TTCIT.....T..A...T.G.....T.....T	420
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	421	GATATTTTACCTATGTGGCTTGAAGATAAGTGGCTTTCCAAAACCGTGTATTGGA	480
	421T.....T.....T.....TTC...T.....A....TA..A.....T	480
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	481	AGTGGTTGCAATCTGGAATTCAGCTCGCTTCGTTATCTCATGAGGAGAGGCTGGAGTT	540
	481	TC.....T...T.....T...A..A..TA..A...T.G....T..A..AT...T...	540
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	541	CACCCATTAAAGCTGCCATGGGTGGATCGTTGGGGAAGATGGTACTCTAGTGTGCGTGT	600
	541	..T.....GTGT..T.....T.....TT.G..T..A.....T...TC...T..A..T	600
		** *	
Bovine LDH modified LDH KCB	601	TGGAGTGGAGTGAATGTTGCTGGTGTCTCCCTGAAGAATTTACACCGTGAATTAGGCACT	660
	601	...TC...T..T.....T.....T...T...A....G..T..A....G..T...	660
		** *	
Bovine LDH modified LDH KCB	661	GATGCAGATAAGGAACAGTGGAAAGCGGTTCAAAACAAGTGGTTGACAGTCTTATGAG	720
	661T.....A....A.....T.....T.....T.....TTC.....A	720
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	721	GTGATCAAACTGAAAGGCTAGACATCGTGGGCAATTGGACTGTCACTGGCGGATTTGGCA	780
	721	..T..T..T.....T..T..T..T.....T.....TT...T..T..T.....T	780
		** *	
Bovine LDH modified LDH KCB	781	GAAAGTATAATGAAGAATCTTAGGCGGGTGCATCCGATTTCCAGCATGATTAAGSGTCTC	840
	781	...TC...T.....A...T.G..AA..A..T.....A....T..T.....A...T.G	840
		** *	
Bovine LDH modified LDH KCB	841	TATGGAATAAAAGAGGATGTCTTCCTTAGTGTTCCTTGCATCTGGGACAGAATGGAATC	900
	841T..T....A....T..TT.GTC.....A..T..T.....T..A....T..T	900
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	
Bovine LDH modified LDH KCB	901	TCAGACGTTGTGAAGTGAAGTCTGAGTGCATGAAGAAGAGGCGTGTGGAAGAAGAGTGCA	960
	901	..T..T.....T.....T...T.....A..T.....A..ATC...T	960
		** *	
Bovine LDH modified LDH KCB	961	GATACAGTTTGGGGATCCAGAAAGAGTSCAGTTTAA	999
	961TT.G....T..T..A.....T....A.....	999
		**** * * * * * **** * * * * * **** * * * * *	

【図 3】

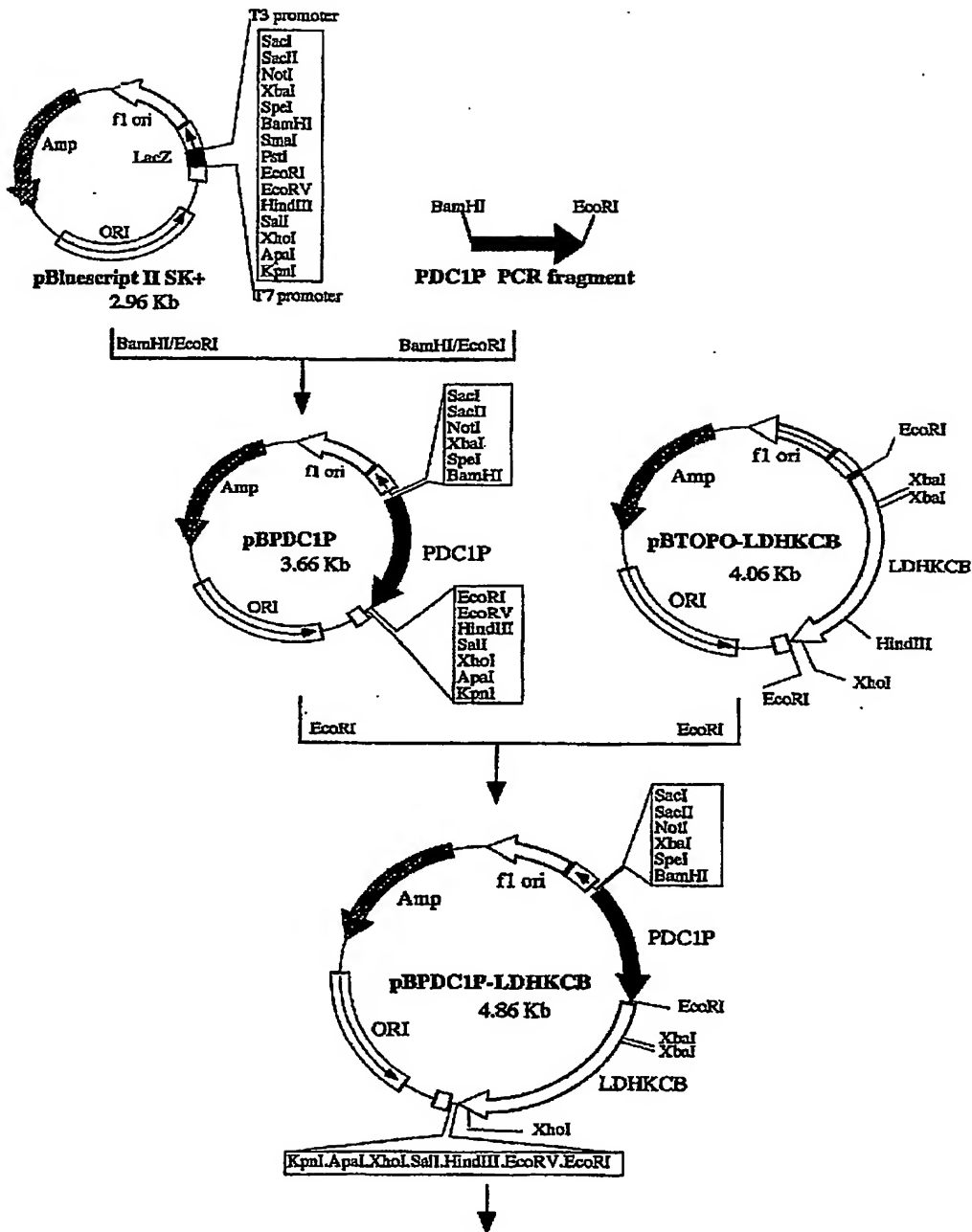


【図 4】

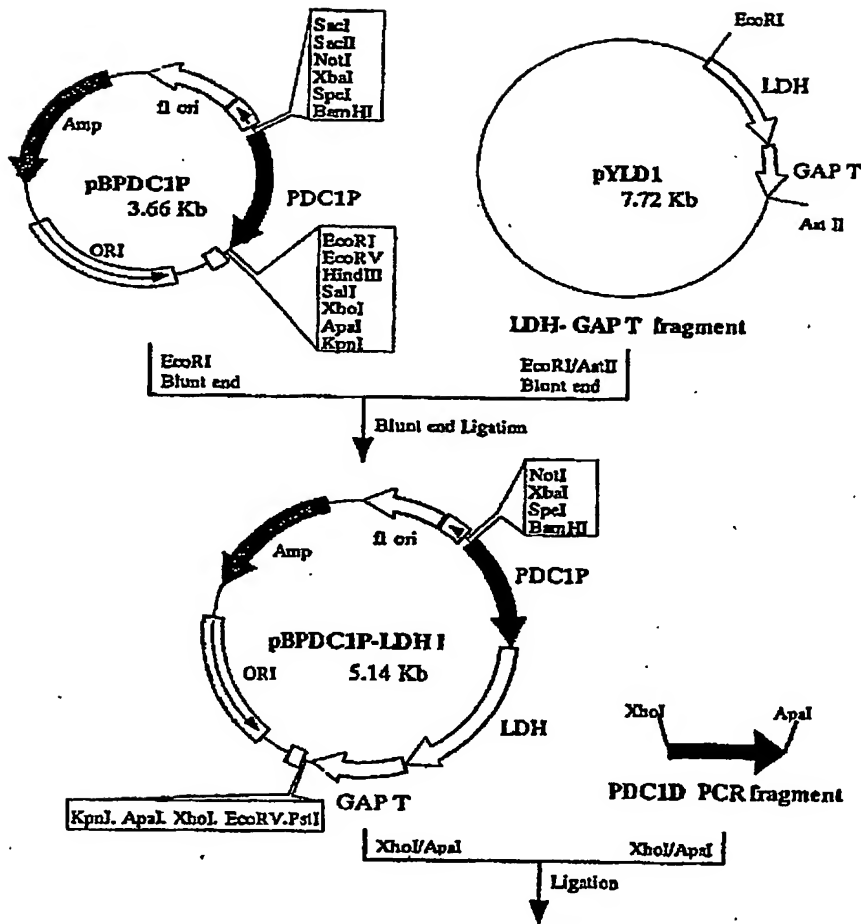


Plasmid name: pBTrp-PDC1-LDHKCB
Plasmid size: 7.13 kb

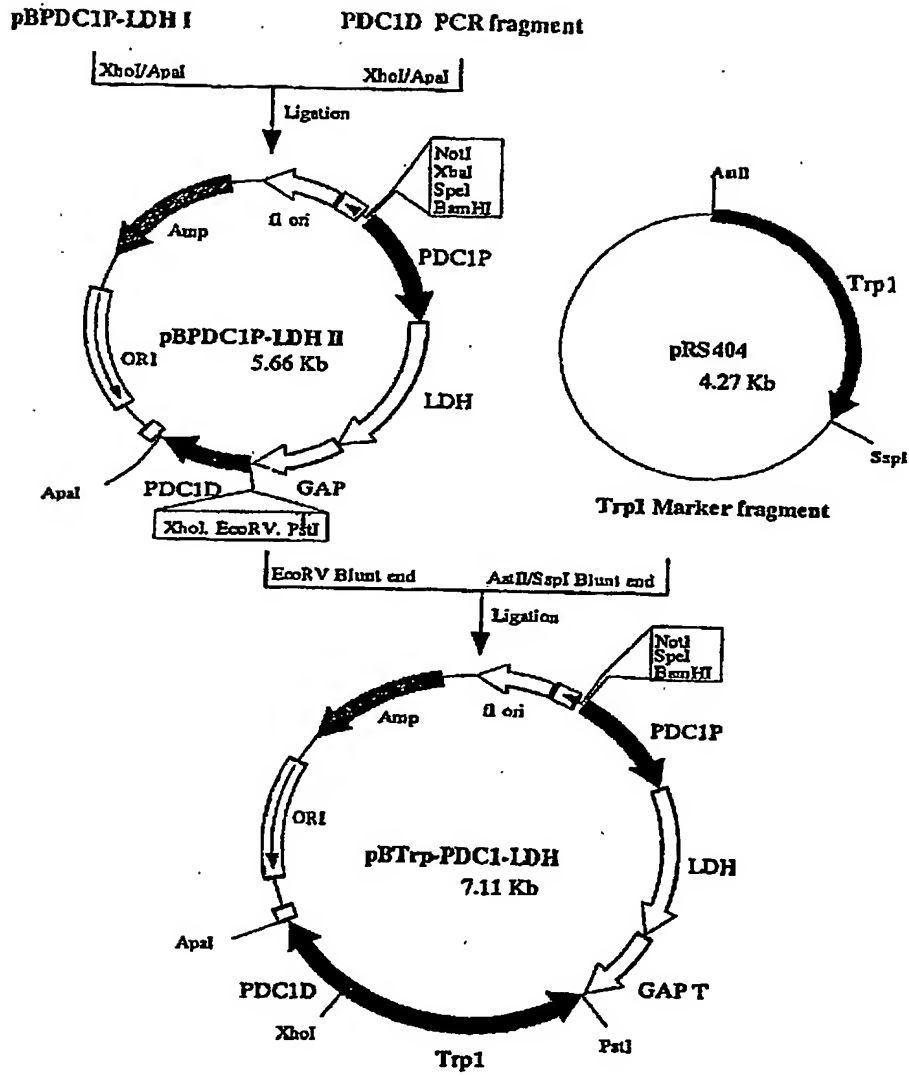
【図 5】



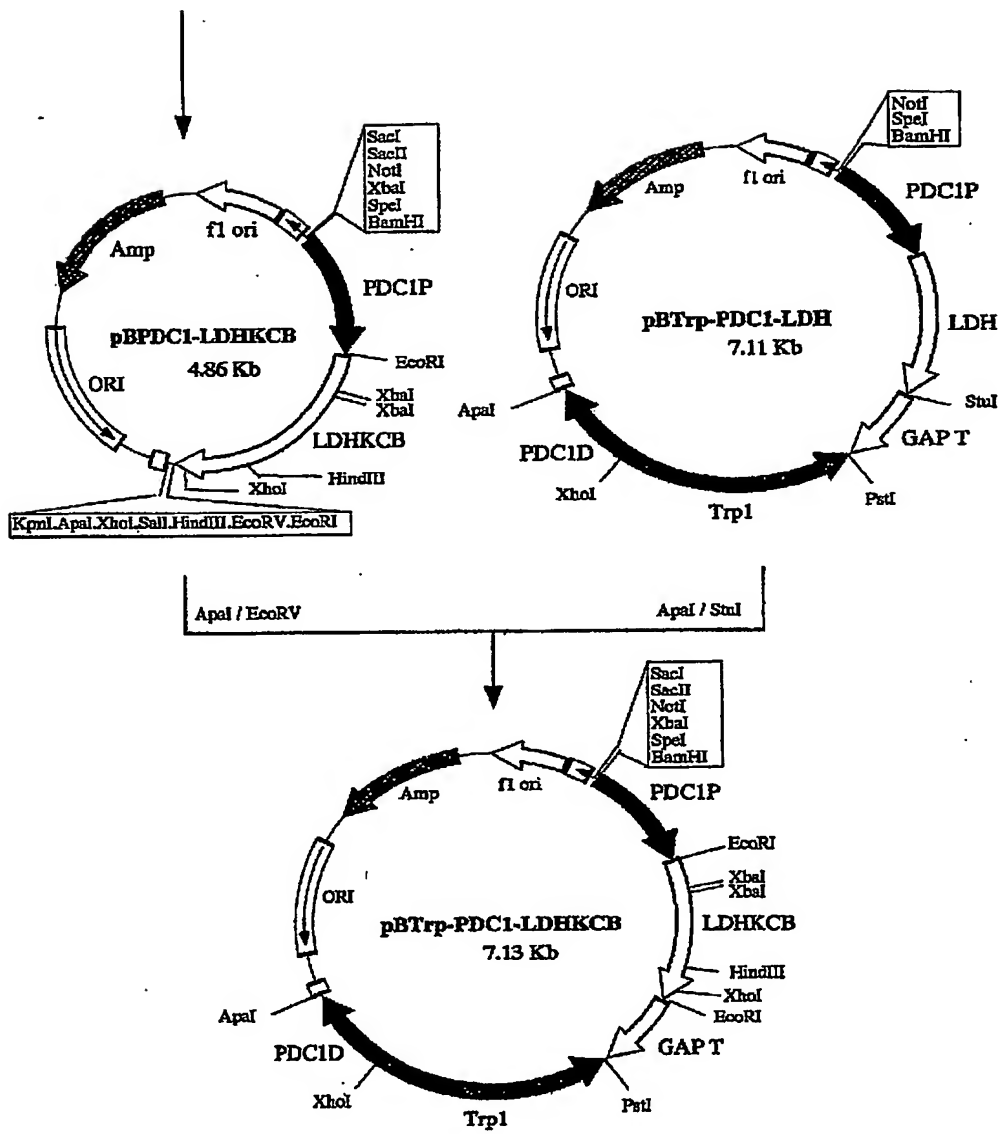
【図 6】



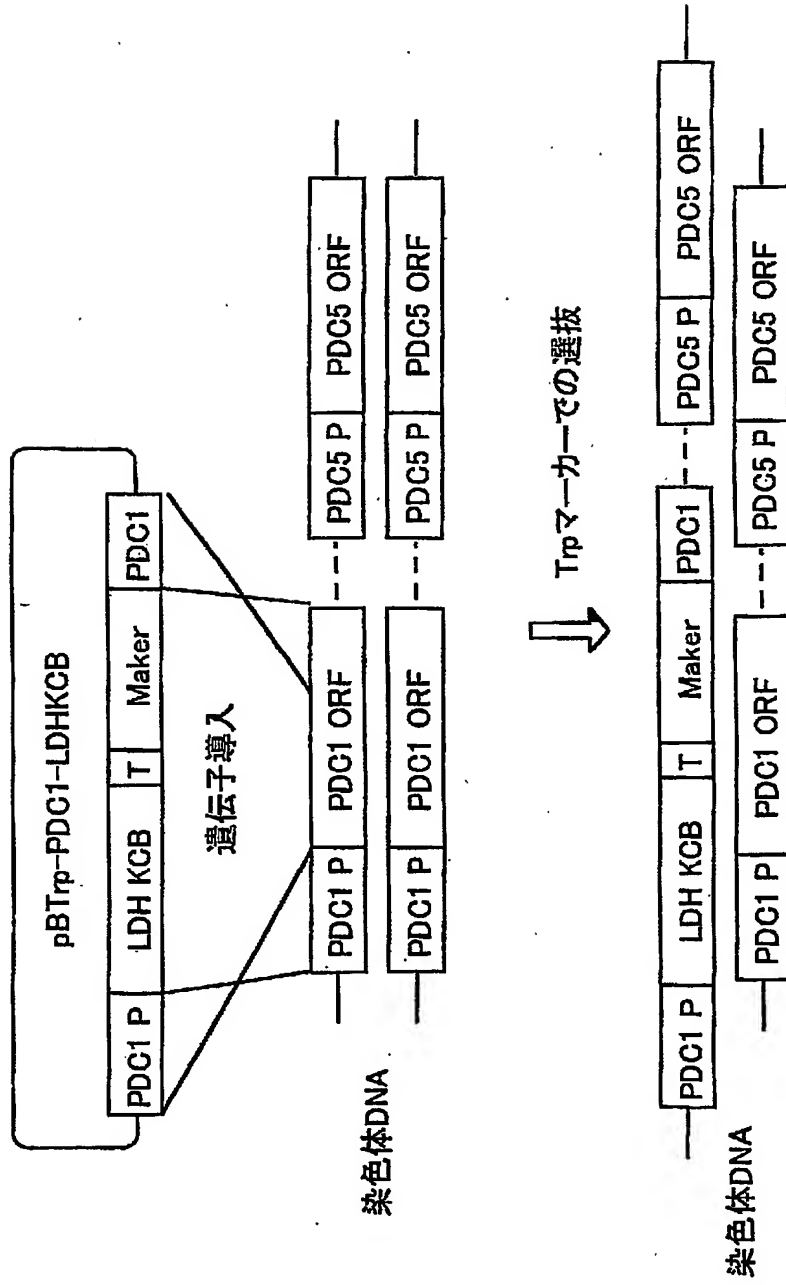
【図 7】



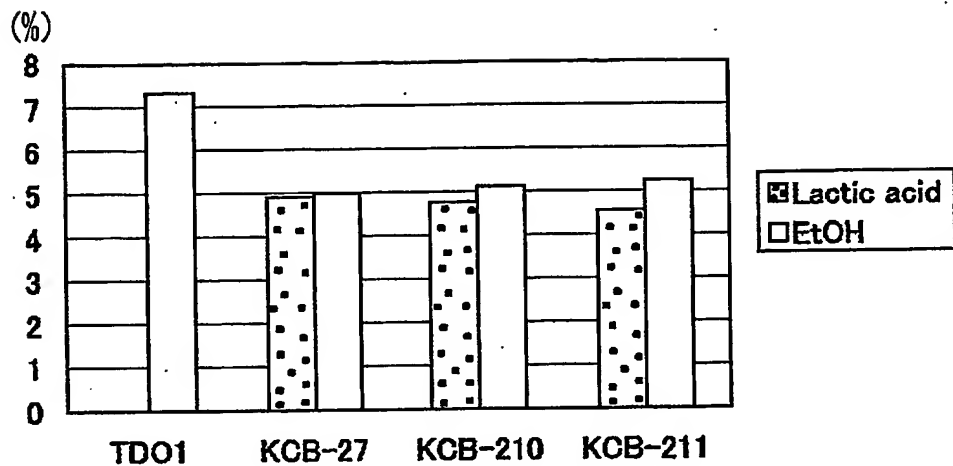
【図 8】



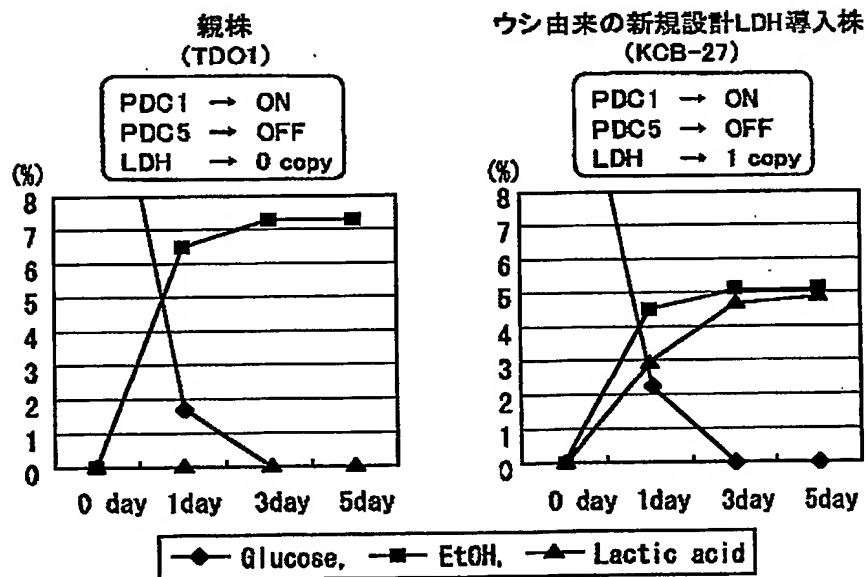
【図 9】



【図10】



【図11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子を有する宿主生物中で乳酸を安定的に大量生産させるための技術を提供する。

【解決手段】 宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが導入されている形質転換体とする。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003609]

1. 変更年月日	1990年 9月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1
氏 名	株式会社豊田中央研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003207]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県豊田市トヨタ町1番地
氏 名	トヨタ自動車株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.